

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16142

研究課題名（和文）直線状のコラーゲン結晶を基にした骨の2分岐パターンの形成原理

研究課題名（英文）The mechanism of patterning of the bifurcated bone formed by linear collagen crystals

研究代表者

黒田 純平（Kuroda, Junpei）

京都大学・理学研究科・特定研究員

研究者番号：80726521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、ゼブラフィッシュのヒレ骨の先端部に分布するコラーゲン繊維の構造体であるアクチノトリキアを「束ねる」という物理的な作用が、ヒレ骨の分岐パターンの形成に重要であるということを見出した。また研究代表者が独自に開発したin vitroの培養系によって、この「束ねる」工程を担っている細胞は、間葉系細胞であることを明らかにした。さらに、FIB-SEMを用いてin vivoにおけるアクチノトリキア周囲の連続電顕観察を行うことで、細長い仮足を複数発達させアクチノトリキアに巻きつく間葉系細胞の詳細な3D構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

形態形成の問題を扱う従来の発生生物学の研究は、基本的には遺伝子変異をベースにしたものが中心であったが、研究代表者は、もっと物理的な作用が骨の形態形成に関わる大きな要因であると考え、実際にアクチノトリキアを物理的な力で束ねる細胞を特定し、この作用が果たす役割について見出した。これまでこのような物理的な作用で、骨の形態形成を説明した例はほかになく、本研究成果が果たす学術的なインパクトは極めて大きいと考える。また魚類の対ヒレと他の脊椎動物の四肢は相同な器官であることから、本研究課題によって得られた知見は、脊椎動物全般の、骨の形態形成原理の理解に大いに貢献できると推測する。

研究成果の概要（英文）：In this research project, I found that the physical effect of "bundling" actinotricia, which is a structure of collagen fibers distributed at the tip of the fin bone of zebrafish, is important for the formation of the branching pattern of the fin bone. In addition, the in vitro culture system that I developed revealed that the cells responsible for this "bundling" process are fin mesenchymal cells. Furthermore, by performing continuous electron microscopic observation around actinotricia in vivo using FIB-SEM, I elucidated the detailed 3D structure of mesenchymal cells that develop multiple filopodia and wrap around actinotricia.

研究分野：発生生物学

キーワード：コラーゲン 細胞外マトリックス 骨 ゼブラフィッシュ 間葉系細胞 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

動物の骨の形成過程では、骨芽細胞の「足場」となる細胞外マトリックスの構造体が必要とされる。また、適切な骨の形態を作り上げるにはこれらの足場構造を適切に配置させ、成長過程でその配置を再編成(リモデリング)させることが重要な工程となる。骨の形態形成原理を理解するためには、各種細胞群と細胞外マトリックスの間で起こる相互作用の時空間的なダイナミクスを捉える研究が望まれるが、多くの場合、分厚い組織の奥深くに埋まっている骨のイメージングを生きたまま行うことは非常に困難である。そこで研究代表者は、薄い表皮の直下に形成され、成長過程を体外から容易に観察できる魚のヒレ骨をモデルに骨の形態形成原理を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、ゼブラフィッシュのヒレ骨の先端部に分布するコラーゲン繊維の構造体「アクチノトリキア」を基にしたヒレ骨の形態形成に着目し、ヒレ骨の分岐パターンの形成原理を解明することを目的に研究を開始した。数理モデルから2分岐パターンを作り出すことに成功しており、このモデルから細胞がアクチノトリキアを「束ねる」という物理的な作用が重要であることが推測されたが、実際の細胞がどのようにこの過程において機能しているのかが不明であった。そこで、まずアクチノトリキアとアクチノトリキアを取り囲む細胞群の可視化を行うために組換え体ゼブラフィッシュの作製に取り組んだ。また、得られた系統からアクチノトリキアと細胞を単離し、*in vitro*でのアクチノトリキアと細胞の相互作用の解析を試みた。

## 3. 研究の方法

### 実験1. アクチノトリキアと間葉系細胞の相互作用を *in vitro* で再現

アクチノトリキアの可視化は、GFP結合型 Actinodin1(アクチノトリキア構成因子の一つ)の発現組換えゼブラフィッシュを作成することで研究代表者がすでに成功している。本研究ではアクチノトリキアのダイナミクスを *in vitro* で詳細に捉えるライブイメージングを行うため、より発現量が高い改変型組換えゼブラフィッシュ系統を作製した。またアクチノトリキアを取り囲む間葉系細胞に着目し、間葉系細胞特異的に蛍光タンパク質(Lifeact-mCherry)を発現させる組換えゼブラフィッシュ系統を作製した。次に得られた可視化系統からアクチノトリキアと間葉系細胞を単離し、*in vitro*での相互作用をタイムラプス撮影により高解像度で観察した。

### 実験2. アクチノトリキアを取り囲む間葉系細胞の3D構造解析

アクチノトリキアと間葉系細胞の *in vivo* での相互作用を理解するために、FIB-SEMを用いた連続電顕法により3D構造解析を行った。実験は理化学研究所・細胞場構造研究チームと共同で行い、観察対象には野生型ゼブラフィッシュの稚魚の尾ヒレを用いた。得られた連続SEM画像の解析は、3D画像解析ソフト・Amiraを用いて行った。

### 実験3. 間葉系細胞特異的に「束ねる」作用を阻害

「束ねる」という物理的な力は、アクチンの重合を介して引き起こされると考えられた。そこで、細胞が発生するこの物理的な力を阻害する目的で、アクチンの重合に機能するRhoAに着目し、機能損失型RhoAの過剰発現系を作製した。ヒレの組織全体で発現させると、ヒレの成長自体が著しく抑制されることが推測されたので、間葉系細胞特異的に過剰発現させる組み換え体ゼブラフィッシュを作製し、表現型を評価した。

### 実験4. アクチノトリキアが放射状に配向しない突然変異体の作製

骨の2分岐パターンの形成には、アクチノトリキアを基部で束ねる、つまり放射状に配置させる、という配向パターンが必要であると考えられた。そこで、アクチノトリキアが綺麗に放射状に配向しない突然変異体の作製を試みた。候補として、ヒレ特異的に発現し、繊維性コラーゲンと会合する可能性が示唆されているタイプコラーゲンに着目した。タイプコラーゲンを構成する因子の1つであるcol9a1cの特異的なgRNAを作製しCRISPR-Cas9システムによってcol9a1cのノックアウト系統を作製し、表現型を評価した。

## 4. 研究成果

### 実験 1-3 の成果

研究代表者が独自に開発した *in vitro* でのライブセルイメージング法を用いて、ヒレ由来の間葉系細胞が単独でアクチノトリキアに直接巻きつき、これを束ねる性質があることを明らかにした(図1)。さらに、理化学研究所の岩根グループとの共同研究により、連続電顕法を用い間葉系細胞は *in vitro* でアクトミオシンの収縮力を利用してアクチノトリキアを束ねる

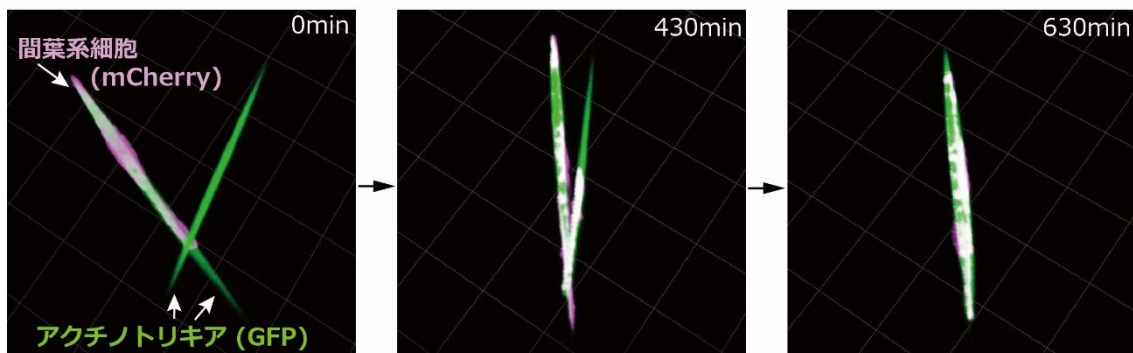


図 1. 間葉系細胞がアクチノトリキアを「束ねる」作用を *in vitro* での再現

て間葉系細胞が *in vivo* で実際に複数のアクチノトリキアに巻きつき束ねる様子の 3D 形態を観察することに成功した。*in vivo* でアクチノトリキアを束ねるプロセスの阻害実験は、間葉系細胞において特異的にアクチン骨格の重合を阻害する方法を用いて行った。この結果、幼生期においてアクチノトリキアの配向性が乱れる異常を誘発することに成功した。以上の成果は国際雑誌である *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (査読あり) に掲載された。また、これらの成果については国内で開催された第 52 回日本結合組織学会、第 43 回日本分子生物学会にて口頭発表を行うことで報告し、日本結合組織学会では若手研究者賞を受賞している。

### 実験 2 の成果

実験 3 で行ったアクチノトリキアを束ねる作用の阻害実験を骨形成が起こる成体期まで持続させることが現段階では困難であったため、代わりの方法として、実験 4 を計画し突然変異体の作製を行った。その結果、アクチノトリキアが規則正しく放射状に配向しないという興味深い表現型を示す変異系統を樹立することに成功した。さらに、この変異体ゼブラフィッシュでは、骨の 2 分岐構造が消失しており、以上の結果からもアクチノトリキアを束ねる力が 2 分岐パターンの形成に必須であることが示された。これらの成果は、国際雑誌である *Developmental Biology* (査読あり) に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Junpei Kuroda, Takeshi Itabashi, Atsuko H Iwane, Toshihiro Aramaki, Shigeru Kondo	4. 巻 0
2. 論文標題 The Physical Role of Mesenchymal Cells Driven by the Actin Cytoskeleton Is Essential for the Orientation of Collagen Fibrils in Zebrafish Fins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.580520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Jingjing Kobayashi-Sun, Shiori Yamamori, Mao Kondo, Junpei Kuroda, Mika Ikegame, Nobuo Suzuki, Kei-Ichiro Kitamura, Atsuhiko Hattori, Masaaki Yamaguchi, Isao Kobayashi.	4. 巻 3
2. 論文標題 Uptake of Osteoblast-Derived Extracellular Vesicles Promotes the Differentiation of Osteoclasts in the Zebrafish Scale	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0925-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hibiki Nakagawa, Junpei Kuroda, Toshihiro Aramaki, Shigeru Kondo	4. 巻 481
2. 論文標題 Mechanical role of actinotrichia in shaping the caudal fin of zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 52-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2021.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Junpei Kuroda, Takeshi Itabashi, Atsuko H Iwane, and Shigeru Kondo
2. 発表標題 Dynamics of collagen crystals essential for the construction of linear fin bones
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田純平, 板橋岳志, 岩根敦子, 近藤滋
2. 発表標題 魚類ヒレの骨格形成に必須なコラーゲン繊維の配向をつくり出す細胞依存的な新規メカニズム
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Junpei Kuroda, Takeshi Itabashi, Atsuko H Iwane, Toshihiro Aramaki, Hibiki Nakagawa and Shigeru Kondo.
2. 発表標題 The mechanism about the growth of collagen crystal involved with fin skeletal development.
3. 学会等名 第52回日本発生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junpei Kuroda, Takeshi Itabashi, Takako M. Ichinose, Shigeru Kondo, Atsuko H Iwane
2. 発表標題 Attempt to understand the cellular function during developmental process from 3D structural model
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junpei Kuroda, Takeshi Itabashi, Atsuko H Iwane, and Shigeru Kondo.
2. 発表標題 The mechanism about the growth of collagen crystal involved with fin skeletal development.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaho Tobiishi, Junpei Kuroda, Atsuko H Iwane, and Shigeru Kondo.
2. 発表標題 Role of collagen crystals as a scaffold for fin-ray bone formation.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関